

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-264246

(43)Date of publication of application : 21.09.1992

(51)Int.CI.

G01N 27/327

(21)Application number : 03-024601

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 19.02.1991

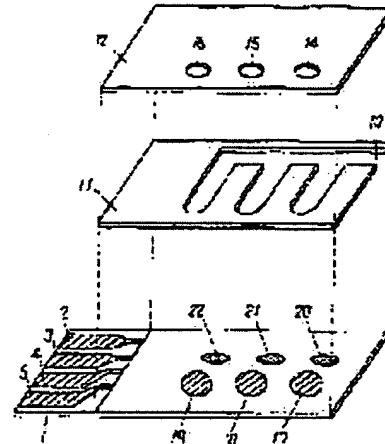
(72)Inventor : YOSHIOKA TOSHIHIKO
NANKAI SHIRO

(54) BIOSENSOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a highly accurate biosensor which can measure multiple components in sample liquid simultaneously.

CONSTITUTION: A plurality of sets of electrode systems are provided on an insulating substrate 1, reaction layers 17,18,19 comprising at least hydrophilic high polymers and enzymes are formed on each electrode system, and further hydrogen ion concentration control parts 20,21,22 are formed between the reaction layers and a tip part of the substrate corresponding to a sample supply hole part to constitute a biosensor. Even if hydrogen ion concentration of sample liquid has not been adjusted in advance, the sample liquid passes through the respective hydrogen ion concentration control parts thereby allowing preparation of hydrogen ion concentrations with which the highest enzyme activities can be obtained. This constitution allows a highly sensitive and highly reliable biosensor which can measure multiple components in sample liquid simultaneously to be realized.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-264246

(43)公開日 平成4年(1992)9月21日

(51)Int.Cl. ⁵ G 0 1 N 27/327	識別記号 7235-2J	序内整理番号 G 0 1 N 27/30	F I	技術表示箇所 3 5 3 U
		7235-2J		3 5 3 J
		7235-2J		3 5 3 R

審査請求 未請求 請求項の数2(全5頁)

(21)出願番号 特願平3-24601	(71)出願人 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地
(22)出願日 平成3年(1991)2月19日	(72)発明者 吉岡 傑彦 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
	(72)発明者 南海 史朗 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
	(74)代理人 弁理士 小嶺治 明 (外2名)

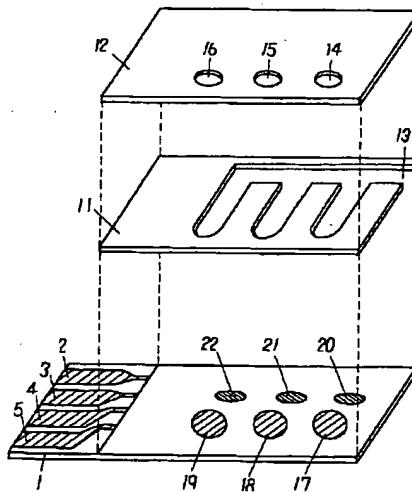
(54)【発明の名称】 バイオセンサ

(57)【要約】

【目的】 試料液中の多成分を同時に測定できる、高精度なバイオセンサを提供する。

【構成】 絶縁性の基板1上に複数組の電極系を設け、各電極系上に少なくとも親水性高分子および酵素からなる反応層17、18、19を形成し、さらに、反応層と試料供給孔部分に相当する基板の先端部との間に水素イオン濃度制御部20、21、22を形成してバイオセンサを構成する。試料液の水素イオン濃度を予め調整しなくとも、試料液が各水素イオン濃度制御部を通ることによって、それぞれ最も高い酵素活性の得られる水素イオン濃度に調製される。この構成によって試料液中の多成分を一度に測定することが可能な高感度、高信頼性のバイオセンサが得られる。

九.八.四 --- 反応層
20.2.22 --- 水素イオン濃度制御部



1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁性の基板上に形成した、測定極と対極を主体とする複数組の電極系と、前記電極系上に設けた親水性高分子と酵素と電子受容体を主体とする複数の反応層と、水素イオン濃度制御部を主体として構成したバイオセンサ。

【請求項2】 絶縁性の基板上に形成した、測定極と対極を主体とする複数組の電極系と、前記電極系上に設けた親水性高分子と酵素を主体とする複数の反応層と、電子受容体を含む水素イオン濃度制御部を主体として構成したバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、試料中の特定成分と酵素との反応により還元された電子受容体の還元量を電気化学的に測定することにより、特定成分を定量するバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なわずに簡易に定量できる方法として、特願平1-274194号に下記のようなバイオセンサが提案されている。

【0003】 このバイオセンサは、絶縁性の基板上にスクリーン印刷などの方法で電極系を形成し、上記電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素を含む層、親水性高分子層および電子受容体を含む層を順に形成したものである。試料液を酵素反応層上へ滴下すると反応層が溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。酵素反応終了後、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき流れる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めるものである。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 酵素活性および酵素の安定性は、種々の要因によって影響を受けることが知られているが、水素イオン濃度(pH)もその一因として挙げられる。酵素を用いてバイオセンサを構成した場合に、高い酵素活性が得られるpHと安定性が保たれる最適pH値は必ずしも一致しない。また、酵素を含む緩衝液を乾燥させたものは、酵素水溶液を乾燥したものに比べて保存安定性が低下するといった問題もある。さらに、試料液中の多成分について同時測定しようとしても、各酵素の最適pH値が一致しないために不可能となる場合がある。

【0005】 本発明はこのような課題を解決するもので、酵素活性が高く安定な、多成分の試料を同時に測定できるバイオセンサを提供することを目的とするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 この課題を解決するため本発明は、絶縁性の基板上に少くとも測定極と対極か

らなる電極系を複数組設け、前記電極系上にそれぞれ反応層を設け、さらに、水素イオン濃度制御部を設けたものである。

【0007】

【作用】 この構成により、バイオセンサの保存時においては酵素を安定な条件下に保つことができる。また、センサに供給された試料液が水素イオン濃度制御部に達することによって、試料液のpHを最も高い酵素活性が得られる値にすることができる。試料液を予め緩衝液などでpH調製する必要がなく、簡易操作が可能となる。

【0008】 さらに、複数組の電極系を用いているため、試料液中の多成分を同時に測定をする場合には、各酵素ごとにそれぞれ独立した水素イオン濃度制御部を設けることによって、各酵素に応じた最適なpH条件下で酵素反応を進行させることができ、極めて信頼性の高い多成分対応のバイオセンサが実現できることとなる。

【0009】

【実施例】 以下に本発明の一実施例のバイオセンサを説明する。

20 【0010】 (実施例1) バイオセンサの一実施例として、糖センサについて説明する。糖の種類としては主にスクロース、グルコース、フルクトースがあり、この3成分によって果実などの甘味が表現できるため、この3成分を同時に測定できるバイオセンサを作製した。

【0011】 図1に本発明のバイオセンサの一実施例として作製した糖センサのうち反応層および水素イオン濃度制御部を除いた構成を示す。図2に測定極と対極を除く糖センサの構成を示す。

【0012】 ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により銀ベーストを印刷しリード2、3、4、5を形成した。つぎに、樹脂バイオインダーを含む導電性カーボンベーストを印刷し、加熱乾燥することにより、測定極6、7、8と対極9からなる電極系を形成した。さらに、電極系を部分的に覆い、電極の露出部分の面積を一定とし、かつリードの不要部を覆うように絶縁性ベーストを印刷し、加熱処理をして絶縁層10を形成した。

【0013】 つぎに、6、7、8、9の露出部分を研磨後、空気中で100°Cにて4時間熟処理を施した。このようにして電極部分を構成した後、親水性高分子としてカルボキシメチルセルロース(以下CMCと略す)、酵素としてグルコースオキシダーゼ(シグマ: EC 1.1.3.4.以後GODと略す)、電子受容体としてフェリシアン化カリウムの混合水溶液を、対極9の一部分と測定極6を覆うようにして展開、40°Cの温風乾燥器中で10分間乾燥させて反応層17を形成した。

【0014】 このように親水性高分子、酵素および電子受容体の混合溶液を一度に滴下、乾燥させることによって製造工程を簡略化させることができる。また、乾燥時の温度範囲としては、酵素の失活がみられず、かつ短時

3

間で乾燥可能な温度ということで20℃から80℃までが適している。

【0015】また、反応層17に用いたGODのようにある程度広いpH値域で酵素活性が維持できる酵素を用い、かつ試料液のpHがそれから大きく違わない場合には、上記のように水素イオン濃度制御部20を省くことができる。

【0016】つぎに、CMC、酵素としてフルクトースデヒドロゲナーゼ(東洋紡：EC1.1.99.1)、フェリシアン化カリウムの混合水溶液を、対極9の一部分と測定極7を覆うようにして展開、乾燥させて反応層18を形成した。つぎに、図2に示すように、スペーサー11の枝分かれした空間部に相当し、かつ反応層18より試料供給孔に近い部分にリン酸緩衝液(pH=4.5)を滴下、乾燥して水素イオン濃度制御部21を形成した。反応層18に用いたフルクトースデヒドロゲナーゼはpH=4.5で酵素活性がほぼ最大値を示す(37℃)。この水素イオン濃度制御部21によって、反応層18に達した試料液のpHは4.5付近となり、酵素活性を最大限に引き出すことが可能となる。また、使用直前まで緩衝液成分と酵素を分離することでセンサの保存特性を向上させることができる。

【0017】つぎに、GOD(シグマ：EC1.1.3.4)、ムタロターゼ(ペーリングガーマンハイム：EC5.1.3.3)、インペルターゼ(シグマ：EC3.2.1.26)をCMC、フェリシアン化カリウムと共に溶解させた水溶液を対極9の一部分と測定極8を覆うようにして展開、乾燥させて反応層19を形成した。次に、図2に示すように、スペーサー11の枝分かれした空間部に相当し、かつ反応層19より試料供給孔に近い部分にリン酸緩衝液(pH=4.5)を滴下、乾燥して水素イオン濃度制御部22を形成した。pH=4.5の条件下では反応層19に用いた3種の酵素は共に効率よく働くことができる。

【0018】この場合、水素イオン濃度制御部21および22の設定pH値が同じため、上記の方法の他に、水素イオン濃度制御部21、22を除去し、その代わりにスペーサー11の枝分かれしている分岐点のうち反応層18および19への分岐点に相当する部分の基板上にリン酸緩衝液(pH=4.5)を滴下、乾燥して水素イオン濃度制御部を形成することもできる。

【0019】上記のようにして複数の反応層および水素イオン濃度制御部を形成した後、カバー12およびスペーサー11を図1あるいは図2中、破線で示すような位置関係をもって接着した。試料液の供給量はカバーとスペーサーによって生じる空間容積に依存するため、予め定量する必要がない。さらに、測定中の試料液の蒸発を最小限に抑えることができ、精度の高い測定が可能となる。

【0020】このようにして作製した糖センサに試料液

4

としてグルコース、フルクトース、スクロースを含む水溶液 $10\mu l$ を試料供給孔13より供給し、2分後に対極を基準にしてそれぞれの測定極にアノード方向へ+0.5Vのパルス電圧を印加し、5秒後の電流値をそれぞれ測定した。測定極17においてはグルコース濃度に対応した電流値が得られ、測定極18においてはフルクトース濃度に対応した電流値が、測定極19においてはグルコースとスクロースの合計濃度に対応した電流値が得られた。測定極19と測定極17から得られた電流値の差よりスクロース濃度を得ることができた。

【0021】水素イオン濃度制御部を通過して予め設定されたpHになった試料液がそれぞれの反応層へ到達し、溶解すると、試料液中の基質は最終的に酵素によって酸化される。そこで移動した電子によってフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。つぎに、上記のパルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づく酸化電流が得られ、この電流値は試料液中の基質濃度に対応した。

【0022】センサ応答電流値は上記糖センサのうち水素イオン濃度制御部を除いて作製した糖センサに比べて約20%の向上が認められた。これより、水素イオン濃度制御部を設けることで高感度なバイオセンサが得られることがわかる。

【0023】(実施例2)ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板上に、実施例1と同様にしてスクリーン印刷により第1図に示した電極部分と同じものを形成し、研磨、熟処理を行った。つぎに、図2に示すように、スペーサー11の枝分かれした空間部に相当し、かつ反応層17に相当する部分より試料供給孔に近い部分に、フェリシアン化カリウムをリン酸緩衝液(pH=5.6)を滴下、加熱乾燥してフェリシアン化カリウムを含む水素イオン濃度制御部20を形成した。さらに、フェリシアン化カリウムを含むリン酸緩衝液(pH=4.5)を滴下、加熱乾燥してフェリシアン化カリウムを含む水素イオン濃度制御部21、22を形成した。この場合においても、実施例1と同様に水素イオン濃度制御部21、22を一つにまとめることが可能である。

【0024】このフェリシアン化カリウムを含む水素イオン濃度制御部を作製する際の加熱温度によって乾燥に要する時間が変化し、その結果フェリシアン化カリウムの結晶粒径をコントロールすることができる。乾燥時間を短くすると結晶粒径は小さくなり、試料液への溶解速度が高められる。よってセンサ応答速度を速くすることが可能である。フェリシアン化カリウムが反応層内で酵素と共存している場合には、加熱によって酵素活性が低下するため、自由に加熱乾燥することはできない。さらに、水素イオン濃度制御部にフェリシアン化カリウムを含ませることによって、センサ作製後、使用直前まで酵素とフェリシアン化カリウムを分離することができ、センサの保存特性を著しく向上させることができる。

【0025】つぎに、GODを0.5wt%CMC水溶液に溶かしたものを、対極9の一部分と測定極6を覆うようにして展開し、乾燥させて反応層17を形成した。つぎに、フルクトースデヒドロゲナーゼを0.5wt%CMC水溶液に溶かしたものを、対極9の一部分と測定極7を覆うようにして展開、乾燥させて反応層18を形成した。さらに、GOD、ムタロターゼ、インペルターゼを0.5wt%CMC水溶液に溶解させたものを対極9の一部分と測定極8を覆うようにして展開、乾燥させて反応層19を形成した。最後に実施例1と同様にスペーサー、カバーと共に一体化して糖センサを作製した。

【0026】このようにして作製した糖センサに、実施例1と同様にして、試料液としてグルコース、フルクトース、蔗糖を含む水溶液 $10\mu l$ を試料供給孔13より供給し、2分後のセンサセンサ応答電流を測定したところ、実施例1と同様に各電極間の電流値より試料液中の各成分濃度を得ることができた。

【0027】センサ応答の時間依存性を調べたところ、実施例1の構成のものに比べて、フェリシアン化カリウムを水素イオン濃度制御部に含むものの方が、より速いセンサ応答が得られた。これは、フェリシアン化カリウムを含む水素イオン濃度制御部を作製する際、温度を制御することによってフェリシアン化カリウムの結晶粒径がより小さくなり、その結果、試料液に対する溶解速度が高まって、全体の反応速度が高められたことによる。

【0028】なお、上記実施例1および2では糖センサについて示したが、本発明は、酵素としてアルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼなどの酵素を自由に組み合わせることによって、グルコース、アルコール、乳酸、コレステロールなど試料液中の測定対象成分に応じたバイオセンサを構成することができる。

【0029】また、上記実施例1および2では3成分の同時測定について述べたが、本発明はこれに限定されるものではなく、電極系の数を増やすことによってより多成分の同時測定を行ふこともできる。

【0030】上記実施例1および2では親水性高分子としてCMCを用いたが、本発明はこれに限定されるものではなく、ビニルアルコール系、セルロース系、ビニルピロリドン系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、デンブン系、無水マレイン酸系、アクリルアミド系、メタクリレ

ート樹脂などを用いてもそれぞれ同様の効果が得られた。

【0031】また、上記実施例1および2では、各電極系を測定極と対極の二極電極系としたが、参照極を加えた三電極方式にすれば、より正確な測定が可能である。

【0032】さらに、電子受容体としては、上記実施例1および2に示したフェリシアン化カリウム以外に、D-ペソゾキノン、フェナジンメトサルフェート、フェロセンなどのレドックス化合物も使用できる。

【0033】一方、水素イオン濃度制御部にはリン酸緩衝液を用いたが、本発明はこれに限定されるものではなく、用いる酵素の最も高い酵素活性が得られるpHを得る緩衝液を自由に用いることができる。酢酸緩衝液のような常温で液体のものであっても、保液性の高い高分子と共に用いることによって水素イオン濃度制御部を構成することができる。

【0034】

【発明の効果】以上の中実施例の説明からも明らかなように本発明によれば、試料液中の複数成分について、試料の水素イオン濃度を予め調整することなく、酵素の特性に応じた最適な水素イオン濃度を設定することができる。その結果、一回の試料供給で複数成分について、より短い時間で高精度な測定のできるバイオセンサが得られる。

【図面の簡単な説明】

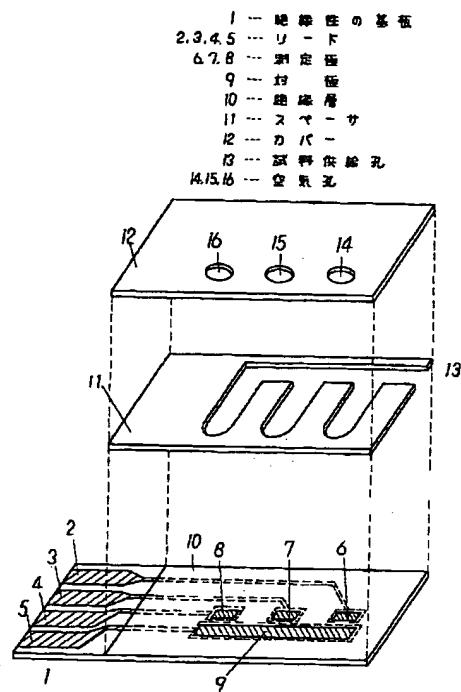
【図1】本発明の一実施例のバイオセンサの、反応層および水素イオン濃度制御部を除いた糖センサの分解斜視図。

【図2】同バイオセンサの実施例の糖センサの測定極と対極を除いた糖センサの分解斜視図。

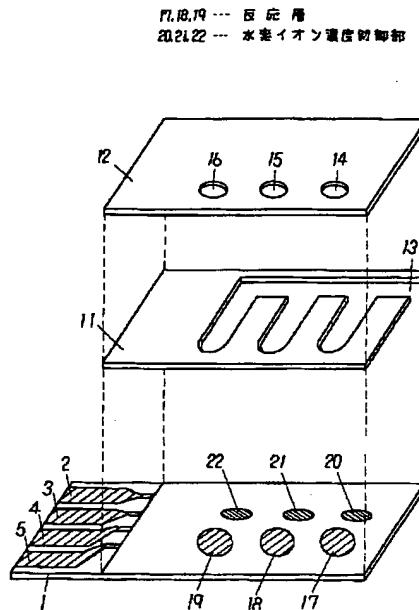
【符号の説明】

- 1 絶縁性の基板
- 2, 3, 4, 5 リード
- 6, 7, 8 測定極
- 9 対極
- 10 絶縁層
- 11 スペーサー
- 12 カバー
- 13 試料供給孔
- 14, 15, 16 空気孔
- 17, 18, 19 反応層
- 20, 21, 22 水素イオン濃度制御部

【図1】



【図2】



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成6年(1994)4月5日

【公開番号】特開平4-264246

【公開日】平成4年(1992)9月21日

【年通号数】公開特許公報4-2643

【出願番号】特願平3-24601

【国際特許分類第5版】

G01N 27/327

【F I】

G01N 27/30 353 U 7235-2J

J 7235-2J

R 7235-2J

【手続補正書】

【提出日】平成5年6月7日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】つぎに、GOD（シグマ：EC1.1.3.4）、ムタロターゼ（シグマ：EC5.1.3.3）、インペルターゼ（ペーリンガーマンハイム：EC3.2.1.26）をCMC、フェリシアン化カリウムと共に溶解させた水溶液を対極9の一部分と測定極8を覆うようにして展開、乾燥させて反応層19を形成した。次に、図2に示すように、スペーサー11の枝分かれした空間部に相当し、かつ反応層19より試料供給孔に近い部分に、リン酸緩衝液（pH=4.5）を滴下、乾燥して水素イオン濃度制御部22を形成した。pH=4.5の条件下では反応層19に用いた3種の酵素は共に効率よく働くことができる。

【手続補正2】 /

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正内容】

【0020】このようにして作製した糖センサに試料液としてグルコース、フルクトース、スクロースを含む水溶液 $10\mu l$ を試料供給孔13より供給し、2分後に対極を基準にしてそれぞれの測定極にアノード方向へ+0.5Vのパルス電圧を印加し、5秒後の電流値をそれぞれ測定した。測定極6と対極9よりグルコース濃度に対応した電流値が得られ、測定極7と対極9よりフルクトース濃度に対応した電流値が、測定極8と対極9よりグルコースとスクロースの合計濃度に対応した電流値が得られた。上記グルコースとスクロースの合計濃度に対応した電流値と、グルコース濃度に対応した電流値の差

よりスクロース濃度を得ることができた。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正内容】

【0023】（実施例2）ポリエチレンテレフタートからなる絶縁性の基板上に、実施例1と同様にしてスクリーン印刷により図1に示した電極部分と同じものを形成し、研磨、熱処理を行った。次に、図2に示すように、スペーサー11の枝分かれした空間部に相当し、かつ反応層17に相当する部分より試料供給孔に近い部分に、フェリシアン化カリウムを含むリン酸緩衝液（pH=5.6）を滴下、加熱乾燥してフェリシアン化カリウムを含む水素イオン濃度制御部20を形成した。さらに、フェリシアン化カリウムを含むリン酸緩衝液（pH=4.5）を滴下、加熱乾燥してフェリシアン化カリウムを含む水素イオン濃度制御部21、22を形成した。この場合においても、実施例1と同様に水素イオン濃度制御部21、22を一つにまとめることが可能である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】このようにして作製した糖センサに、実施例1と同様にして、試料液としてグルコース、フルクトース、スクロースを含む水溶液 $10\mu l$ を試料供給孔13より供給し、2分後のセンサ応答電流を測定したところ、実施例1と同様に各電極間の電流値より試料液中の各成分濃度を得ることができた。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

(2)

3

【補正方法】変更

【補正内容】

【0034】

【発明の効果】以上の実施例の説明からも明らかなよう
に本発明によれば、試料液中の複数成分について、試料
の水素イオン濃度を予め調整することなく、酵素の特性
に応じた最適な水素イオン濃度を設定することができる。
その結果、一回の試料供給で複数成分について、よ
り短い時間で高精度な測定のできるバイオセンサが得ら
れる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】本発明のバイオセンサの実施例の糖センサのう
ち、反応層および水素イオン濃度制御部を除いた分解斜

4

視図

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】同バイオセンサの実施例の糖センサの測定極と
対極を除いた分解斜視図

【手続補正8】

10 【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】符号の説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【符号の説明】

17、18、19、反応層20、21、22 水素イオ
ン濃度制御部